

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑫ 公開特許公報 (A)

平4-59735

⑤ Int.Cl.⁵A 61 K 37/14
9/127

識別記号

ABZ
L

庁内整理番号

8317-4C
7624-4C

④公開 平成4年(1992)2月26日

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全15頁)

⑤ 発明の名称 ヘモグロビン含有リポソーム

② 特願 平2-166631

② 出願 平2(1990)6月27日

⑦ 発明者 岡本 武 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社
内

⑧ 出願人 テルモ株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

⑨ 代理人 弁理士 高木千嘉 外1名

明細書

1. 発明の名称 ヘモグロビン含有リポソーム

2. 特許請求の範囲

- (1) ヘモグロビン、電子供与体および該電子供与体から電子を受け取ってメトヘモグロビンをヘモグロビンに還元する作用を有する電子伝達体を含む水溶液を、脂質2分子膜からなるリポソームの内部に封入してなるヘモグロビン含有リポソーム。
- (2) 前記電子伝達体の前記水溶液中の濃度が $0.1 \times 10^{-10} \sim 1 \mu M$ であることを特徴とする請求項1記載のヘモグロビン含有リポソーム。

(3) 前記電子供与体がビリジンヌクレオチド補酵素類である請求項1または2に記載のヘモグロビン含有リポソーム。

(4) 前記ビリジンヌクレオチド補酵素類が、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドおよび β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェートもしくはこれらの誘導体からなる群から選ばれた1種類または2種類以上の組成物である

請求項3記載のヘモグロビン含有リポソーム。

(5) 前記電子伝達体が、メチレンブルーである請求項1ないし4のいずれかに記載のヘモグロビン含有リポソーム。

(6) 前記電子供与体のヘモグロビンに対する添加率が0.5~10(重量モル比)である請求項1ないし5のいずれかに記載のヘモグロビン含有リポソーム。

(7) 前記ヘモグロビン内包リポソームの内部には、さらに有機リン酸および/又は縮合リン酸を封入してなる請求項1ないし6のいずれかに記載のヘモグロビン含有リポソーム。

3. 発明の詳細な説明

(1) 産業上の利用分野

本発明は、新規なヘモグロビン含有リポソームに関する。

本発明のヘモグロビン含有リポソームは、緊急時の代用血液移植臓器の保存液、微小循環系への酸素運搬液、血液ガス分析等の標準液等として使用される。

(2) 従来の技術

血液の代用と成り得る薬剤、いわゆる人工血液の研究開発は50年以上の歴史を持ち、その間、ゼラチン分解産物の溶液・デキストラン溶液等の血漿增量剤が代用血液（代用血漿）として利用されてきた。しかし、これらの代用血液は、大量出血等の緊急時に血管内の血漿量を補充し、循環動態を維持する目的で開発された製剤で、血液の多種多様な特性と機能を代替することはできない。

近年、こうした血漿増量剤とは異なり、酸素運搬能を保持する人工血液（人工赤血球）の研究開発が進められている。これらは、大別するとフッ化炭素エマルジョン(perfluorochemical: PFC [通称: fluorocarbon])を素材とした化学合成品と、天然ヘモグロビンもしくはその誘導体を素材とした半合成品とに分類される。前者のPFC製剤は、炭化水素の水素原子をフッ素原子で置き換えた物質で、酸素分圧に比例した大きな酸素溶解能力（水の約20倍）を持つが酸素運搬機構は水中に分散したPFCエマルジョンへの酸素の物理

的溶解に過ぎず、十分量の酸素を溶解させるためには吸入酸素濃度を高く維持する必要があり、高濃度酸素障害の危険性も危惧される。また、脂溶性の化学合成品でもあるため輸注後の体内蓄積性等の問題点も指摘されている。

一方、酸素運搬能を持った人工血液として赤血球膜成分を除去した天然ヘモグロビンを利用できないかという考えが古くから有り、いくつかの実験報告もある。しかし、ヘモグロビンを静脈内に注入すると一部はhaptoglobinやalbuminと結合して存在するが、大部分は遊離の状態で速やかに腎から排泄され、肝その他の細胞内皮系においても捕獲・代謝されるため急速に体循環血中から消失する（4時間以内）。また、正常赤血球中に比較して遊離のヘモグロビンは酸素親和性が増加する傾向にあり、末梢組織での酸素放出能の低下、血管外漏出ヘモグロビンに起因した腎肺障害の可能性といった問題点も指摘されている。しかし、ヘモグロビンの酸素解離曲線はS字状を呈しており、PFC製剤のような酸素分子の物理的溶解とは異

なる特性を持つ。最近、こうしたヘモグロビン水溶液の低い酸素運搬能と短い生体内半減期を改善した修飾ヘモグロビン（安定化ヘモグロビン・重合ヘモグロビン）やマイクロカプセル化（リボソーム化等）ヘモグロビン、あるいは新規のキレート化合物を人工血液として用いる開発検討が中心と成りつつある。

(3) 発明が解決しようとする課題

前述したヘモグロビンを基調とする人工赤血球の酸素運搬機能はヘモグロビンと酸素分子との可逆的結合により生じ、ヘム鉄（プロトヘムIX）の原子価が2価の状態(Fe^{2+})でのみ保たれる機能である。一方、ヘモグロビンはその可逆的酸素化(Oxygenation)の過程で徐々に酸化(Oxidation)され酸素結合能を持たない3価のメトヘモグロビン(Fe^{3+})に変化する。このため正常赤血球は、種々の酸化的ストレスに対し、ヘモグロビンが酸化されるのを抑制する機構（ラジカルスカベンジャー等）と生成したメトヘモグロビンを還元し、もとの生理機能を有するヘモグロビン

に戻す修復機構（NAD(P)H-メトヘモグロビン還元酵素系等）とが共存し“oxygenation-oxidation-reduction”のサイクルを繰り返しながら酸素運搬体としての機能をダイナミックに発現しているものと解釈される。

しかし、こうした天然赤血球の持つ酸化的ストレスに対する抵抗性は、溶血により極端に低下し、ヘモグロビン水溶液においては前述の酸化抑制機構は消失しており、4℃保存状態下においてもメトヘモグロビンの占める割合いは経時的に増加する。このため、天然ヘモグロビンならびにその誘導体を医薬品や試薬として使用する場合には、通常、メト化抑制剤（酸化防止剤もしくは安定化剤）を添加する必要がある。酸化防止剤として、例えば、亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、硫酸第一鉄、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム等の物質が知られている。これらの抗酸化作用は確実ではあるが、生体に対して有害となる。特に臨床においては時に数千ccにもおよぶ大量輸血も行われることもあり、代用血液への適用には好ま

しくない。

還元型グルタチオンやアスコルビン酸等は、生体内でメト化抑制物質として機能することが知られているが、これらのメト化抑制には他の赤血球成分が関与しており、単独でヘモグロビン水溶液に添加しても十分な効果を得ることはできない。特に好気的実験条件下（大気中37°C）でヘモグロビンとアスコルビン酸とを共存させた場合、急速なヘモグロビン変性（緑色沈殿物etc.）を生ずる。また、還元型グルタチオンに関しても前述と同様の条件下で添加量に依存したメト化抑制効果は得られず、有効性・安定性等の観点からいずれもヘモグロビンのメト化抑制剤として不十分であった。

また、トコフェロール（ビタミンE）類は古くから非特異的抗酸化作用を持ち、生体膜脂質の抗酸化が第一義的作用であろうと言われ、食品中の不飽和脂肪酸やビタミンA・カロチン等の医薬品に酸化防止剤として用いられている。実際、不飽和脂質系リポソームの過酸化ならびに過酸化反応に起因する蛋白質変性を効率良く抑制することが

できるが、トコフェロール自体は脂溶性物質であるため、リポソーム内水相で進行するヘモグロビンの自動酸化や活性酸素ラジカルによるメト化を十分に抑制することはできない。

トコフェロールと同様に生体認容性に優れ、輸液剤としても広く使用されている糖類・アミノ酸類もヘモグロビンのメト化抑制作用を持つことが知られている（特公昭61-1620号公報）。しかし、還元性基を有するグルコース等はヘモグロビンと非酵素的に結合してグルコヘモグロビンを生成し、また、前述の特公昭61-1620号公報にも記載されているように、十分なメト化抑制効果を得るためにには生体の血糖値に比較して高濃度に添加する必要がある等、必ずしも生理的であるとは言い難い。

さらに、従来公知のメト化抑制剤の効果は、ある種の環境下で生成する反応性の高い活性酸素ラジカル等を消去することにより得られる予防的抗酸化作用である。したがって、既に生成したメトヘモグロビン濃度を減少させる効果は通常期待できない。

本発明の目的は、種々の環境下で生成するメトヘモグロビンをもとの酸素運搬能を有するヘモグロビンに還元し、結果として酸化安定性を改善した人工赤血球懸濁液を提供することにある。

(4) 課題を解決するための手段

本発明によれば、ヘモグロビン、電子供与体および該電子供与体から電子を受け取ってメトヘモグロビンをヘモグロビンに還元する作用を有する電子伝達体を含む水溶液を、脂質2分子膜からなるリポソームの内部に封入してなるヘモグロビン含有リポソームであって、前記電子伝達体の前記水溶液中の濃度が $0.1 \times 10^{-10} \sim 1 \mu M$ あることを特徴とするヘモグロビン含有リポソームが提供される。

リポソーム内部に封入される電子供与体は、ビリジンヌクレオチド補酵素類、特に β -ニコチンアミドアデニンヌクレオチドおよび β -ニコチンアミドアデニンヌクレオチドホスフェートもしくはこれらの誘導体が好ましい。電子供与体のヘモグロビンに対する添加量比は 0.5~10（重

量モル比）が良好な効果を与える。上記電子供与体から電子を受け取ってメトヘモグロビンをヘモグロビンに還元する作用を有する電子伝達体は、メチレンブルーが好ましい。電子伝達体の使用量は、前記水溶液における濃度として、 $0.1 \times 10^{-10} \sim 1 \mu M$ 、好ましくは $0.1 \times 10^{-10} \sim 0.1 \mu M$ である。前記ヘモグロビン等を含む水溶液はさらに有機リン酸もしくは、縮合リン酸を含有することもできる。

以下に本発明をさらに詳細に説明する。

本発明のヘモグロビン含有リポソームは酸素運搬体としてのヘモグロビンとメトヘモグロビン還元に必要な1種類以上の電子供与体ならびに電子伝達体を含有する。本水溶液の主要成分は天然赤血球由来のヘモグロビンであり、他の構成成分として、ヘモグロビンの経時的酸化によって生成するメトヘモグロビンをヘモグロビンに還元するための電子供与体ならびに電子伝達体を添加する。また、ヘモグロビンの酸素運搬能調整を目的として、イノシトールリン酸、ピリドキサールリン酸、

アデニンリン酸等の公知の有機リン酸化合物もしくは結合リン酸化合物を含んでいてもよい。

ヘモグロビンは原料用血液として正常人赤血球もしくは期限切れ濃厚赤血球製剤等を用い、すでにストローマ・フリー・ヘモグロビン (Stroma Free Hemoglobin) の調製法として公知の方法を利用して調製される。以下、各工程の概略を説明する。

① 全血の採取

② 全血は、連続遠心機により血漿、白血球・血小板等を除去し、さらに生理食塩水を用いて遠心洗浄を連続的に行ない粗洗浄赤血球とする。

③ 粗洗浄赤血球は引き続き血漿分離器（例えば、孔径 $0.45\mu\text{m}$ のセルロースアセテート膜）により、生理食塩水を用いて繰り返し洗浄し、血漿・白血球・血小板等を完全に除去した洗浄赤血球を得る。

④ 得られた洗浄赤血球に過剰量（およそ2～3倍の容量）の蒸留水もしくは低張溶液を添加して、赤血球溶血液とする。

上の電子供与体ならびに電子伝達体を添加して調製される。また、精製したヘモグロビン分画中に天然赤血球由来のチトクローム b_5 、NADH・チトクローム b_5 還元酵素、NADPH・フラビン還元酵素ならびに活性酸素除去に関与するカターゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンバーオキシダーゼ等の物質等を混在させることもできる。

前記低張緩衝液としては、リン酸緩衝液、HEPES緩衝液、TES緩衝液等を用いることができる。

電子供与体としては、ビリジンヌクレオチド補酵素類、特に好ましくは β -（還元型）ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドおよび β -（還元型）ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート、もしくはこれらの誘導体として知られている3-アセチルビリジンアデニンジヌクレオチド (3-アセチルビリジン-DPN)、チオニコチニアミドアデニンジヌクレオチド (テオ-DPN)、3-ビリジンアルデヒドDPN、ニコ

⑤ 赤血球溶血液は、水酸化ナトリウム溶液を用いてpH7.4に調整した後、連続遠心処理を行ってストローマ等を除去したヘモグロビン水溶液を回収する。

⑥ このヘモグロビン水溶液は、前述の血漿分離器さらに血漿成分分離器（例えば、孔径 $0.1\mu\text{m}$ のセルロースアセテート膜）を連続的に通過させて、遠心処理により除去しきれなかった赤血球膜成分の除去と溶血液の無菌化を行う。

⑦ 上記の操作により得られた溶血液は、低分子量物質（分画分子量：50,000以下）の除去ならびに水素イオン濃度（pH=7～8）および電解質濃度の至適化を目的とした透析処理を行った後、ヘモグロビン濃度がおよそ40～50g/dlの範囲内に成るように限外濾過を用いて濃縮する。本発明に使用するヘモグロビン水溶液は、上述の工程で得られたヘモグロビン分画あるいは限外濾過・カラムクロマトグラフィー・塩析等、生化学分野で一般に使用される公知の方法を用いてさらに精製したヘモグロビン分画水溶液に1種類以

チニアミドヒボキサンチニヌクレオチド（デアミノ-DPN）等を挙げることができる。

本発明の目的であるメト化抑制効果を効率良く発現させるためには、電子供与体はいずれも還元型として溶液中に存在する必要がある。そのため、これらの電子供与体添加は、ヘモグロビン水溶液の最終調製工程（リボソーム化直前等）もしくは用時調製とすることが好ましいが、目的によっては調製初期の段階で添加することもできる。この場合には添加後の透析・限外濾過による損失を考慮し、透析液に同濃度の電子供与体を添加する等の適当な対応を講ずる必要がある。

電子供与体の還元型と酸化型の存在比率は溶液の水素イオン濃度と密接に関連し、天然赤血球の構成成分でもある還元型ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドおよび還元型ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドホスフェートについては、弱アルカリ性条件下（pH=8～9）で最も安定となり、ヘモグロビンの自動酸化速度もpHの上昇と共に減少する。こうした観点から調製の各工程にお

けるヘモグロビン水溶液のpHは若干高い値に維持することが好ましい。一方、基本的機能であるヘモグロビン酸素運搬能（酸素放出能）については、pHの増加に伴い低下する傾向にある。以上の点を考慮すると、最終調製ロットにおける本溶液のpHは7~8の範囲内に調整することが好ましい。

ビリジンヌクレオチド類の添加量は、使用する個々の物質ならびに目的とする効果の持続時間等により若干異なるが、通常ヘモグロビンに対する重量モル比としては、およそ0.5~10、特に医薬品として大量に調製する場合には価格等も考慮し、ヘモグロビンに対する重量モル比としては、およそ0.5~3の範囲内の添加が推奨できる。

ヘモグロビン水溶液に添加する電子伝達体としては、メチレンブルーをあげることができる。ヘモグロビン水溶液への添加は、電子供与体添加直後が最も効率的であるが、目的により添加時期を遅らせることもできる。例えば、上述の電子供与体を添加したヘモグロビン水溶液をリポソーム化する直前に添加することも可能である。しかし、

濃度は、 $1 \times 10^{-10} \mu M$ 以上であることが好ましい。なお、従来よりメトヘモグロビン血症の治療を目的としてメチレンブルー等の電子伝達体を生体内に投与することが行われているがこの方法においては、血液中における拡散・希釈を考慮して比較的高濃度の電子伝達体を投与しなければならず、安全性が十分であるとはいえず、しかも局所的に作用させることが難かしいという欠点があった。これに対し、本発明におけるヘモグロビン含有リポソームはリポソーム内にヘモグロビン、電子供与体および電子伝達体が封入されてなるので電子伝達体の濃度を上述のような比較的低濃度に設定しても、メトヘモグロビンの生成を効率よく抑制する作用を有する点で、従来の方法とは本質的に区別されるべきものである。

電子供与体（還元型）濃度はメトヘモグロビン還元に伴って低下（酸化型）するため、ヘモグロビン濃度の増減に伴いビリジンヌクレオチド類の添加量を調整する必要があるが、電子伝達体の酸化還元対は、電子供与体（NAD(P)H等）な

当該物質は、電子供与体が存在しない好気的環境下でヘモグロビンの酸化速度を顕著に増大する。したがって、この点を考慮して電子供与体と共存状態と成るように電子伝達体を添加する必要がある。

ヘモグロビン水溶液中の電子伝達体の濃度は（リポソーム内水相に封入されるHb水溶液中の濃度に等しい）は、通常 $0.1 \times 10^{-10} \sim 1 \mu M$ 、より好ましくは $0.1 \times 10^{-10} \sim 0.1 \mu M$ である。すなわち電子伝達体は、ビリジンヌクレオチド類と異なり、ヘモグロビンに与える影響が複雑で濃度変化に対する反応性も高く、過剰量の添加はヘモグロビンの酸化・変性を引き起こす。このため可能な限り添加量を減少させる必要があり、電子伝達体の濃度は通常 $1.0 \mu M$ 以下に維持する必要がある。特に、本実施例に記載したような人工酸素運搬体を目的とする場合、電子伝達体濃度は、 $0.3 \mu M$ 以下に維持することが好ましい。

また、ヘモグロビン水溶液中でのメトヘモグロビン生成を充分に抑制するために、電子伝達体の

ならびに電子受容体（メトヘモグロビン等）存在下で相互に再生・利用することができる。このため、電子伝達体添加量は、通常ヘモグロビン濃度に依存して調整する必要はない。

電子供与体ならびに電子伝達体の添加方法は特に限定されず、ヘモグロビン水溶液中に均等に混和できる方法であれば、試薬形態（結晶・凍結乾燥品・水溶液等）も自由に選択することができるが、ヘモグロビンの酸化防止という観点から4℃以下の低温に維持することが好ましい。また、同様の目的で従来公知の予防的酸化剤もしくは安定化剤をヘモグロビン水溶液中に混在させることも可能である。

ヘモグロビン水溶液には、さらに有機リン酸化物および／又は縮合リン酸塩を添加しておいてもよい。その代表例としては、イノシトールヘキサリン酸、ピリドキサールリン酸、グルコース-6-リン酸、アデニントリホスフェート、アデニジホスフェート、グルコース-1,6-ジリン酸および縮合リン酸塩などを挙げることができ、

これらをくみあわせて用いることもできる。これらはヘモグロビンのアロステリック因子としてヘモグロビンと酸素との親和性を変化させて、末梢組織への酸素運搬能を増加させる機能を持つ。

次に上述したヘモグロビン等を含有する水溶液を内部液として用いたリポソームの調製法を説明する。

人工細胞・ドラッグデリバリーシステム(D. D. S.)として使用されるリポソームは、形態的に見て3種類に大別される。脂質膜が幾重にも袋状に成った多重層リポソーム(MLV: multi-lamellar vesicle, or liposome)一枚の脂質膜に囲まれ、粒径の小さい小単層リポソーム(SUV: small uni-lamellar vesicle, or liposome)粒径の大きい大単層リポソーム(LUV: large uni-lamellar vesicle, or liposome)の3種である。通常、直徑0.4μm以下の小単層リポソームが最も適しているが、現時点における技術的制約により、数層(3~4層程度)の脂質膜から成る多重層リポソームも含まれる。

動的調節に使用できるが、これらはすべてのリポソーム形成に不可欠というものではない。

一方、リポソームの形成とは異なる観点から、トコフェロール同族体も添加される。前述したようにトコフェロール(ビタミンE)は、非特異的な抗酸化作用を持つ生体成分で古くから食品類・医薬品類の酸化防止剤として使用されてきたが、本発明においても酸化防止剤として、リポソーム膜あるいはヘモグロビンの安定性に寄与する。特に、不飽和脂質を含有するリポソームでは、重要な構成成分となる。

リポソーム化型剤の調製にあたっては種々の方法が知られており、特に調製方法を限定する必要はないが、リポソームに封入するヘモグロビンは、温度・光・水素イオン・金属イオン(Cu^{2+})・溶存ガス等により容易に酸化・変性することとなる。したがって、この点を考慮して、すでにD. D. S. 等の分野で公知の方法から調製法を選択する必要がある。

例えば、ガラスピーズ搅拌法、界面活性剤除去

リポソームを構成する脂質としては、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ガングリオシド(G)、カルジョリビン(CL)、スフィンゴミエリン(SM)、ホスファチジルグリセロール(PG)およびこれらを常法にしたがって水素添加した物が挙げられる。

上述の脂質成分は、水中で熱力学的に安定なミセルを形成させるために不可欠な成分であり、これらの脂質を組み合わせて使用することもできる。

また、これらの脂質以外にコレステロール(Chol)、ジセチルホスフェート(DCP)、ステアリルアミン(SA)等が添加されることもある。コレステロールはリポソームの形成・膜の安定化を目的として通常添加されるほかに、リポソーム膜の透過性を調節するためにも使用できる。同様に、ジセチルホスフェート・ホスファチジン酸(負荷電)、ステアリルアミン(正荷電)等の電荷付与物質についても、リポソームの生体内挙

法、フレンチプレス法、カルシウムイオン融合法、バールポンピング法、ワーリングブレンダー(高速搅拌)法、脱水・再水和法、凍結・融解法等を用いることができる。

かくして得られるリポソームは、ヘモグロビン、電子供与体および電子伝達体を含む水溶液を内包しており、人工赤血球として優れた機能を有する。本発明においては、上記人工赤血球を生理的溶解質液に懸濁させる。生理的电解質液としては、輸液等に通常使用されているもの例えば生理食塩水が使用される。懸濁液中のヘモグロビン濃度は、5(v/v)%~15(v/v)%が適当である。

(5) 作 用

本発明のヘモグロビン水溶液は天然赤血球由来のヘモグロビンもしくはこれらを基調とするヘモグロビン誘導体に、少なくとも1種の電子供与体ならびに電子伝達体を添加して調製される。当該溶液の調製過程で添加した還元型NAD(P)Hは電子供与体としての機能を持ち、同じく調製過程で添加したメチレンブルー等の外因性電子伝達

体を担体としてメトヘモグロビンを還元する。

このため、ヘモグロビンの酸化により生じ、生体内で酸素運搬能を低下させる要因となるメトヘモグロビン濃度を抑制し、結果的に酸素運搬能を安定化する作用を示す。また、このヘモグロビン水溶液のリボソーム化は、脂質2分子膜を疎水性バリアーとしてヘモグロビンの保護および内部環境を維持する作用を有する。

(6) 実施例

以下、本発明の実施例に基づいて具体的に説明する。

なお、特に明示しない場合、調製の各工程は冷藏状態 (+4°C) に維持し、無菌的環境下で実施した。また、試薬・器具類は滅菌処理を行い、重金属イオン、無機イオン等の残留の無い無菌超純水 (15megΩ·cm 25°C以上) [バイロジエンフリー] を調製に使用した。

[実施例-1／ヘモグロビン水溶液の調製]

① ヘモグロビンの抽出・精製

始血期限切れ液厚赤血球15L (200ml × 75bags)

凍結乾燥試薬) を電子供与体として、また、電子伝達体として最終溶液濃度が 0.3μM と成るようメチレンブルー ($C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 4H_2O$) を 5ml の HEPES (*) 緩衝液 (10mM, pH=7.4) に溶解し、ヘモグロビン水溶液中で均一に成るように添加・混合した。

(*) HEPES : 2-(4-Hydroxyethyl-1-piperazinyl)ethanesulfonic acid

[実施例-2／ヘモグロビン水溶液の調製]

① ヘモグロビンの抽出・精製

ヘモグロビン水溶液の基本的調製方法は、実施例-1 の①に準じて行ったが、赤血球溶血操作は洗浄赤血球に対して4倍容の10mM水酸化ナトリウム水溶液を添加して行った。また、ヘモグロビン以外の残存微量成分除去を目的として、分画分子量100,000の限外濾過ならびに超純水に対する透析処理(分画分子量: 50,000)を行った。

② 試薬添加

上述の方法で得られたヘモグロビン水溶液50ml に、ヘモグロビンと重量モル比が等しく成るよう

を連続遠心機を用いて生理食塩水で洗浄し、混在する血小板・白血球等の血漿成分を除去した粗洗浄赤血球を得た。さらに、孔径0.45μmの血漿分離器を用いて生理食塩水洗浄を行い、この洗浄赤血球 5L に対して低張リン酸緩衝液 (10mM, pH=7.4) を 10L 添加して溶血させた。孔径0.45μmの血漿分離器および孔径 0.1μm の血漿成分分離器を用いて赤血球膜成分の除去ならびに無菌通過を行い、ヘモグロビン濃度 8(v/v)% の赤血球膜除去ヘモグロビン水溶液約 12L を回収した。

得られた水溶液をホローファイバー型ダイアライザーを用いて 10mM HEPES 緩衝液 (pH=7.4) に対して透析を行った後、限外濾過により濃縮し、ヘモグロビン濃度 50(v/v)% の赤血球膜除去ヘモグロビン水溶液約 1.8L を調製した。

② 試薬添加

上述の工程を経て調製したヘモグロビン水溶液 50ml にヘモグロビンに対する重量モル比 (NADH · Na₂ / Hb) で 2 倍量相当の還元型 β -NADH · Na₂ (BMY, grade II / 98%

に還元型 β -NADPH · Na₄ (BMY, 98% 凍結乾燥試薬) ならびにイノシトールヘキサリン酸ナトリウム (SIGMA Chem. Co.) および 5 mM 相当のグルコース-6-リン酸ナトリウム (SIGMA Chem. Co.) と電子伝達体として 0.1 μM に相当するメチレンブルー ($C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 4H_2O$) を 5ml の TES (**) 緩衝液 (10mM, pH=7.4) に溶解し、ヘモグロビン水溶液中で均一に成るように添加・混合した。

(**) TES : N-[Tris(hydroxyethyl)-methyl]-2-aminoethanesulfonic acid

[実施例-3／リボソームの調製]

① ヘモグロビン水溶液のリボソーム化

水素添加率 90% の精製飽和ホスファチジルコリン (EPC)、コレステロール (Chol)、ミリスチン酸ナトリウム (MA)、トコフェロール (TOC) の均一混合粉末 (日本精化、ブレゾム / EPC : Chol : MA : TOC = 7 : 7 : 2.4 : 0.28 [モル比]) 9.0g と “実施例-1” もしくは “実施例-2” で調製したヘモグロビン水

溶液50mlをワーリングブレンダー(WARING CO., Blender 7010S)で搅拌混合(4°C, 1分間)・冷却(-20°C, 15分間)を繰り返し行った。

この懸濁液はバール細胞破砕器(PARR CO.)に入れ、ヘリウムガスで100kg/cm²に加圧して30分間放置後、この圧力を維持した状態でバール細胞破砕器の細隙ノズルから吐出させてリポソーム化を行った。

② ヘモグロビン封入リポソームの精製

上記の処理により得られた溶液を約10倍容の生理食塩水を用いて希釈し、懸濁液とした後、高速遠心機(17,000rpm × 30min at 4°C)を用いて分離した。効率良くヘモグロビンを封入しているリポソームはこの遠心処理により沈殿物として回収された。リポソーム化されずに残存する遊離ヘモグロビンおよび原料脂質成分を含む上清はデカントーションで除去した。以上の洗浄操作を上清が透明に成るまで繰り返し行った後、0.45μmのメンプランフィルターを用いて通過し、懸濁液中に混在する粗大粒子を除去した。最終的に生理食塩水

を用いてヘモグロビン濃度が10%と成るように調整し、人工赤血球懸濁液、約40mlを回収した。

[実施例・4／リポソーム化製剤の調製]

① ヘモグロビン水溶液のリポソーム化

水素添加率90%の精製飽和ホスファチジルコリン(EPC)、コレステロール(Chol)、ミリスチン酸ナトリウム(MA)、トコフェロール(TOC)の均一混合粉末(日本精化、プレソーム/EPC:Chol:MA:TOC=7:7:2.4:0.28[モル比])9.0gに等量の5 mMトコフェロールリン酸ナトリウム水溶液を加えて水和・膨潤処理を行った。この原料脂質に“実施例・1”もしくは“実施例・2”で調製したヘモグロビン水溶液50mlを添加し、ワーリングブレンダー(WARING CO., Blender 7010S)を用いて高速搅拌(4°C, 1分間)・冷却(-20°C, 15分間)を繰り返し、リポソーム化を行った。

② ヘモグロビン封入リポソームの精製

上記の処理により得られた溶液を約10倍容の生理食塩水を用いて希釈し、懸濁液とした後、高速

遠心機(17,000rpm × 30min at +4°C)を用いて分離した。効率良くヘモグロビンを封入しているリポソームはこの遠心処理により沈殿物として回収された。リポソーム化されずに残存する遊離ヘモグロビンおよび原料脂質成分を含む上清はデカントーションで除去した。以上の洗浄操作を上清が透明に成るまで繰り返し行った後、0.45μmのメンプランフィルターを用いて通過し、懸濁液中に混在する粗大粒子を除去した。最終的に生理食塩水を用いてヘモグロビン濃度が10%と成るように調整し、精製人工赤血球懸濁液、約40mlを回収した。

[ヘモグロビン経時酸化率の測定]

ヘモグロビンの経時酸化は37°Cインキュベーション開始時の可視領域(460nm～700nm)における吸収スペクトル(oxy Hb)を基点(酸化率=0%)として、一定時間ごとに吸収スペクトルを測定した。測定終了後にフェリシアン化カリウムもしくは亜硝酸ナトリウムを添加し、得られた吸収スペクトル(met Hb)を終点(酸化率=100%)として、oxy Hbならびにmet Hbの特異吸収帯にお

ける各測定時間までの吸光度変化量からヘモグロビン酸化率を算出した。

結果を表1および第1図に示す。

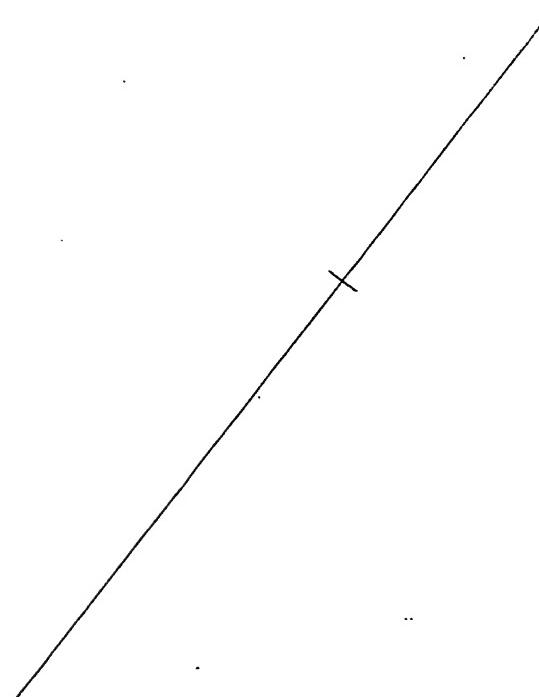


表 1

鉄原子の状態	Hb (還元型) \leftrightarrow HbO ₂ (酸素化型) \leftrightarrow met Hb(酸化型)	
	Fe ²⁺	Fe ²⁺
色	赤紫色	赤色
吸収極大 (λ _{max})	555nm	540nm
等吸収点	430nm	523nm

Hb : デオキシヘモグロビン、HbO₂ : オキシヘモグロビン、
met Hb : メトヘモグロビン

ビン水溶液、そして第2図(c)は還元型NADHおよび0.9μM濃度のメチレンブルーを添加したメトヘモグロビン水溶液におけるメトヘモグロビンの経時的還元による吸収スペクトルの変化をそれぞれ示すグラフである。過剰量の還元型NADHの単独添加では、コントロールと同様、ほとんどメトヘモグロビンの還元は進行していないことがわかる。一方、電子伝達体を添加したサンプルにおいては、経時にメトヘモグロビン還元が進行しオキシヘモグロビンのスペクトルに変化していくことが確認できた。さらに、1時間間隔で得られたスペクトル変化量は、電子伝達体添加量に依存して増大する傾向を示していた。

分析例 2

試薬類未添加のヘモグロビン水溶液をコントロールとして、実施例・1に記載した試薬類添加ヘモグロビン溶液の37℃、好気的条件下におけるヘモグロビン経時の酸化率を比較した。結果を第3図に示す。第3図はヘモグロビンの経時の酸化率(%)を示すグラフである。第3図において、曲線①はヘモグロビン水溶液、曲線②、③は還元型NADPH、0.3μMの

分析例 1

メトヘモグロビン (SIGMA Chem. Co.)に還元型NADHを添加した溶液を用いて、メトヘモグロビン還元に与える電子伝達体の効果を検討した。測定は、50mM HEPES緩衝液 (pH=7.4, 37℃) 中で好気的状態下、0.075g/5mlメトヘモグロビン水溶液をコントロールとして実施した。試料として、同濃度メトヘモグロビン水溶液に過剰量の還元型NADHを添加した4サンプルを調製し、この4サンプルに対して濃度の異なる電子伝達体を添加し、上述の可視領域における吸収スペクトル変化を1時間間隔で測定した。電子伝達体としてメチレンブルーを用いて得られた典型的スペクトル変化を第2図に示した。第2図(a)はメトヘモグロビン水溶液、第2図(b)は還元型NADHを添加したメトヘモグロビン水溶液、第2図(c)は還元型NADHおよび0.3μM濃度のメチレンブルーを添加したメトヘモグロビン水溶液、第2図(d)は還元型NADHおよび0.6μM濃度のメチレンブルーを添加したメトヘモグロ

ビン水溶液、曲線①はヘモグロビン水溶液、曲線②は還元型NADHおよび0.3μMのメチレンブルーを添加したヘモグロビン水溶液、曲線③は還元型NADH、0.3μMのメチレンブルーおよび5mMグルコース-6-リン酸ナトリウムを添加したヘモグロビン水溶液におけるヘモグロビンの経時の酸化率をそれぞれ示す。第3図に示したように、グルコース-6-リン酸ナトリウム併用時においても効率の良いメト化抑制効果が得られた。

分析例 3

試薬類未添加のヘモグロビン水溶液をコントロールとして、実施例・2に記載した試薬類添加ヘモグロビン水溶液および実施例1-①で調整したヘモグロビン水溶液に0.45μMに相当するメチレンブルーを添加したヘモグロビン水溶液の37℃、好気的条件下におけるヘモグロビン経時の酸化率を比較した。結果を第4図に示す。第4図はヘモグロビンの経時の酸化率(%)を示すグラフである。第4図において、曲線①はヘモグロビン水溶液、曲線②、③は還元型NADPH、0.3μMの

メチレンブルー、イノシトールヘキサリン酸ナトリウムおよび5 mMのグルコース・6・リン酸ナトリウムを添加したヘモグロビン水溶液を添加したヘモグロビン水溶液におけるヘモグロビンの経時的酸化率をそれぞれ示す。第4図に示したように、グルコース・6・リン酸ナトリウムおよびイノシトールヘキサリン酸ナトリウムの併用時においても効率の良いメト化抑制効果が得られた。

また、メチレンブルー非共存状態下における、メチレンブルー単独添加が、ヘモグロビン経時酸化に与える影響を曲線④として示した。過剰量のメチレンブルー添加においてメトヘモグロビンの生成が惹起されることがわかる。

分析例 4

試薬類未添加のヘモグロビン封入リボソーム溶液をコントロールとして、実施例・2および実施例・4に記載した試薬添加ヘモグロビン封入リボソーム溶液を調製し、37°C、好気的条件下におけるヘモグロビン経時的酸化率を比較した。結果を第5図に示す。第5図はヘモグロビンの経時的酸

化率(%)を示すグラフである。第5図において曲線①はヘモグロビンのみを含む水溶液を含有するリボソーム、曲線②は還元型NADPH、0.1 μMのメチレンブルー、グルコース・6・リン酸ナトリウムおよびイノシトールヘキサリン酸ナトリウムを添加したヘモグロビン水溶液を含有するリボソームにおけるヘモグロビンの経時的酸化率をそれぞれ示す。第5図に示したように、リボソーム化およびグルコース・6・リン酸ナトリウムならびにイノシトールヘキサリン酸ナトリウム併用時においても効率の良いメト化抑制効果が得られた。

〔ヘモグロビン水溶液ならびに本発明のヘモグロビン含有リボソーム懸濁液の物性値〕

実施例に記載したヘモグロビン水溶液ならびに、本発明のヘモグロビン含有リボソーム懸濁液の物理・化学的特長を表2と表3に示した。

得られたヘモグロビン水溶液のメト化率は、通常3%以下に維持することが可能であった。また、最終的に得られた個々の人工赤血球は2~7枚の

脂質2分子膜構造を有する平均粒径210nmの閉鎖小球状形態を持ち、調製した懸濁液の可視吸光度スペクトルから封入したヘモグロビン水溶液がリボソーム中においてもオキシヘモグロビンの状態を保持し、調製直後のメトヘモグロビンの占める割合を5%以下に維持することが可能であった。

表2 ヘモグロビン水溶液特性値

ヘモグロビン濃度	45%
ヘモグロビンメト化率	1%
水素イオン濃度(pH at 37°C)	7.4
溶液粘度	150cp
無菌試験	(-)
リムラス試験	(-)

表3 本発明の人工赤血球懸濁液の特性値

ヘモグロビン濃度 (ヘモトクリット相当値)	5% (20%)
平均粒子径	210nm
総脂質濃度 (TLC-15 ^(*))	35mg/ml 110
ヘモグロビンメト化率	4%
浸透圧比(生理食塩水に対して)	1.0
無菌試験	(-)
リムラス試験	(-)

(*) : ヘモグロビン濃度を15%に調整した人工赤血球懸濁液中の全脂質濃度(mg/ml)

(7) 発明の効果

天然赤血球の基本的機能である酸素運搬能は、ヘモグロビンが酸素と可逆的に結合することにより生ずる。こうした結合は、ヘム鉄(プロトヘムIX)の原子価が2価の状態(Fe²⁺: Hb)でのみ保たれる機能である。

既に述べたように天然赤血球の酸化的ストレスに対する高い抵抗性は溶血により極端に低下しており、天然赤血球から従来公知の方法で調製したヘモグロビン水溶液では、メトヘモグロビンの占める割合は冷蔵状態(4°C)においても次第に増加していく。また、ヘモグロビンのメト化抑制を目的として従来使用されている抗酸化剤は、予防的酸化防止剤であり、メトヘモグロビン濃度を経時に減少させることはできない。

本発明のヘモグロビン水溶液におけるメト化抑制効果は、調製過程で外部から添加した電子供与体と人工的電子伝達体との非酵素的還元によって生ずるため、外的な要因によって生成したメトヘモグロビンを還元し、酸素運搬能を保持したヘモグロビンに再生する機能も期待される。また、非酵素的還元であるため、冷蔵保存(4°C)状態下においてもヘモグロビンの経時的酸化を効率良く抑制することができる。

当該ヘモグロビン水溶液中で進行するメトヘモグロビン還元は非酵素的反応であるが、電子供与

した場合、調製過程で添加した電子供与体ならびに電子伝達体は循環血流中で速やかに希釈される。このため、電子受容体であるメトヘモグロビンへの電子移動が阻害され、効率の良い還元能を維持することが困難となる。さらに、酸素運搬能に直接関与するヘモグロビンも、循環血流中から急速に代謝・排泄されるため、代用血液としての有用性は臨床上期待できない。こうした生体内投与に伴う問題点を改善する上で、リボソーム化は有用である。リボソームを構成する脂質2分子膜は、外部環境からヘモグロビンを保護し、同時に非酵素的還元に必要な電子供与体ならびに電子伝達体濃度等の反応至適条件を維持することにより、メトヘモグロビンへの電子移動を円滑に行うための内部環境を保持し、結果としてメトヘモグロビン還元能の安定性ならびに効率を向上させる効果を持つ。

本発明のヘモグロビン含有リボソームは、メトヘモグロビンの還元に必要な電子供与体ならびに電子伝達体を外部から添加して調製するため、天

体と電子伝達体共存下で進行し、通常使用される還元剤に比較して、還元作用が穏やかである。このため、メトヘモグロビンを直接還元するようなハイドロサルファイト等の還元剤添加時に見られるヘモグロビン変性等を生ずることが無い。実際、ハイドロサルファイト等はメトヘモグロビンを直接還元することができるという点で優れているが、強い還元力を有するため、過剰量添加が困難であり、長期間還元作用を安定に維持することができず、生体に対する安全性も危惧される。これに対し、本発明の電子供与体として添加するビリジンヌクレオチド類はメトヘモグロビンを直接還元することはできず、適当な中間電子伝達体を介して還元が進行し、主に電子供与体の増減は効果の持続時間、電子伝達体濃度は作用強度に影響を与える。このことは、ヘモグロビンの経時酸化に対し、長期間安定な抑制効果を引き出す上で重要な利点となる。

代用血液等の目的で、前記ヘモグロビン水溶液をリボソーム化することなく、直接血管内に投与

した場合、調製過程で添加した電子供与体ならびに電子伝達体は循環血流中で速やかに希釈される。このため、電子受容体であるメトヘモグロビンへの電子移動が阻害され、効率の良い還元能を維持することが困難となる。さらに、酸素運搬能に直接関与するヘモグロビンも、循環血流中から急速に代謝・排泄されるため、代用血液としての有用性は臨上期待できない。こうした生体内投与に伴う問題点を改善する上で、リボソーム化は有用である。リボソームを構成する脂質2分子膜は、外部環境からヘモグロビンを保護し、同時に非酵素的還元に必要な電子供与体ならびに電子伝達体濃度等の反応至適条件を維持することにより、メトヘモグロビンへの電子移動を円滑に行うための内部環境を保持し、結果としてメトヘモグロビン還元能の安定性ならびに効率を向上させる効果を持つ。

4. 図面の簡単な説明

第1図はヘモグロビンの経時的酸化による吸収スペクトルの変化を示すグラフである。

(a)～第2図(e)

第2図はメトヘモグロビンの還元に与える電子伝達体の効果を示すグラフである。

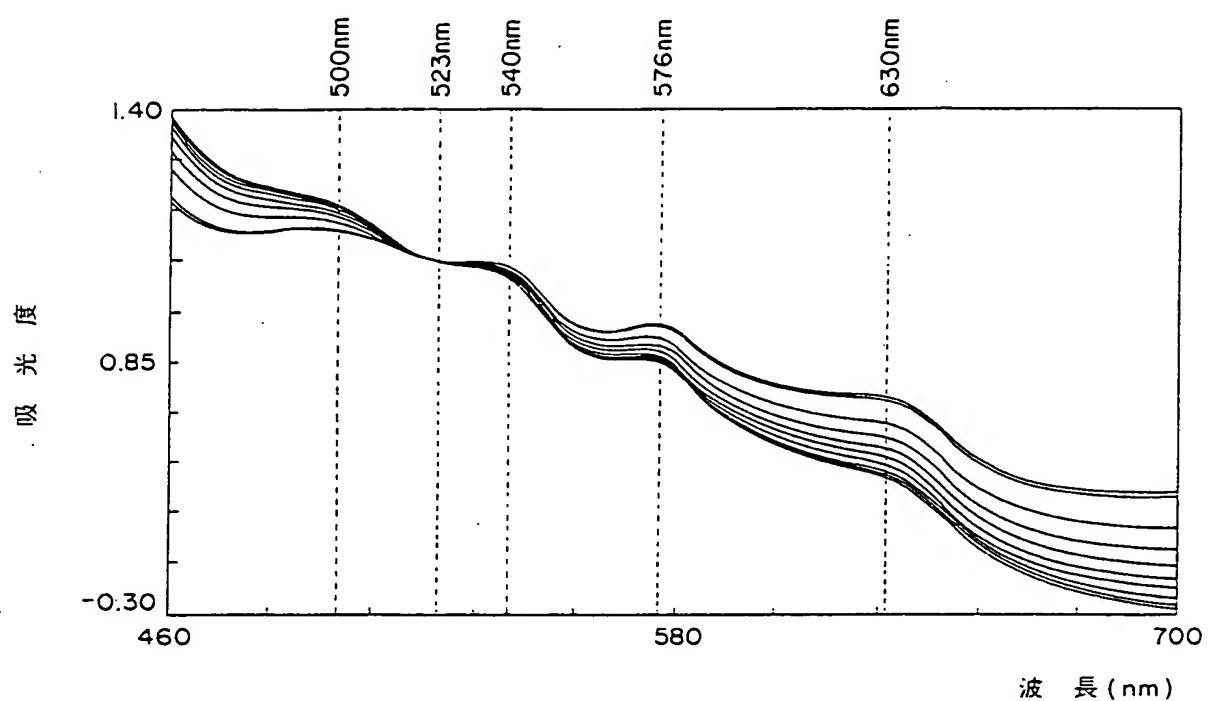
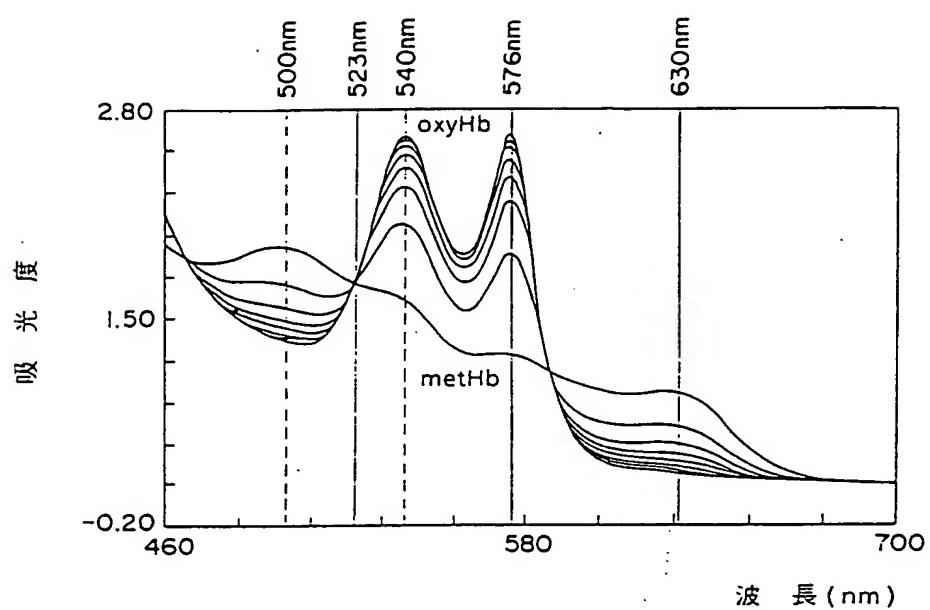
第3図～第5図はそれぞれヘモグロビンの経時の酸化率を示すグラフである。

特許出願人 テルモ株式会社

代理人 弁理士 高木千

(外1名)





第 2 図
(a)

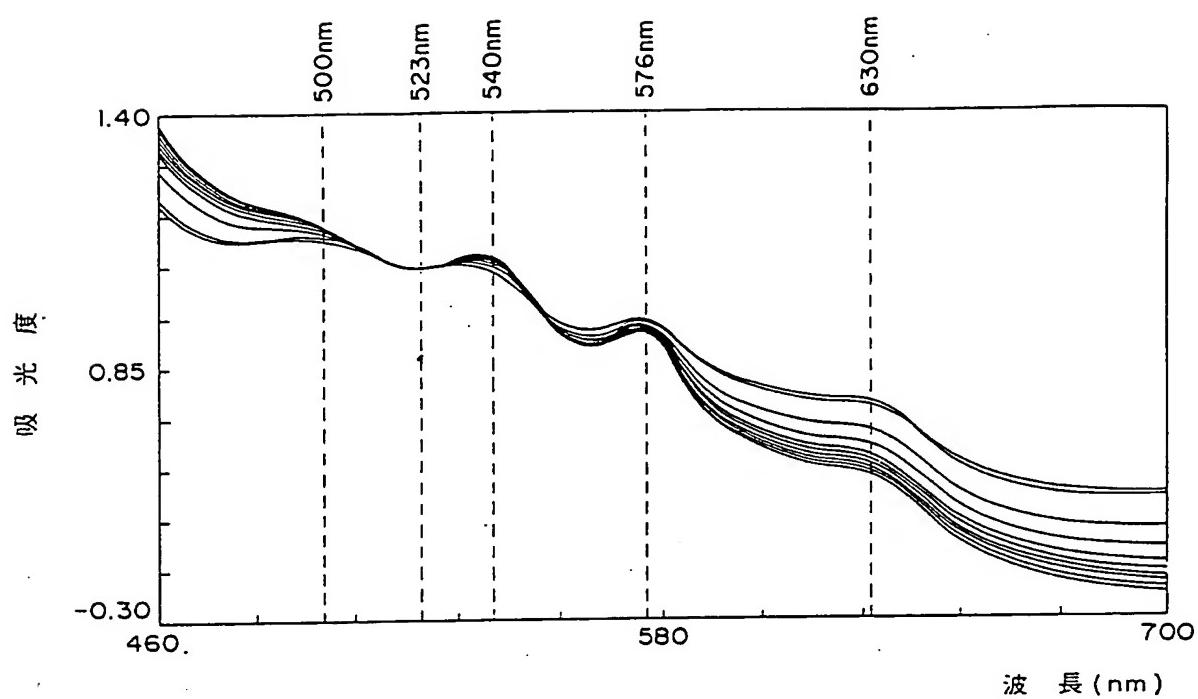


図 2 (b)

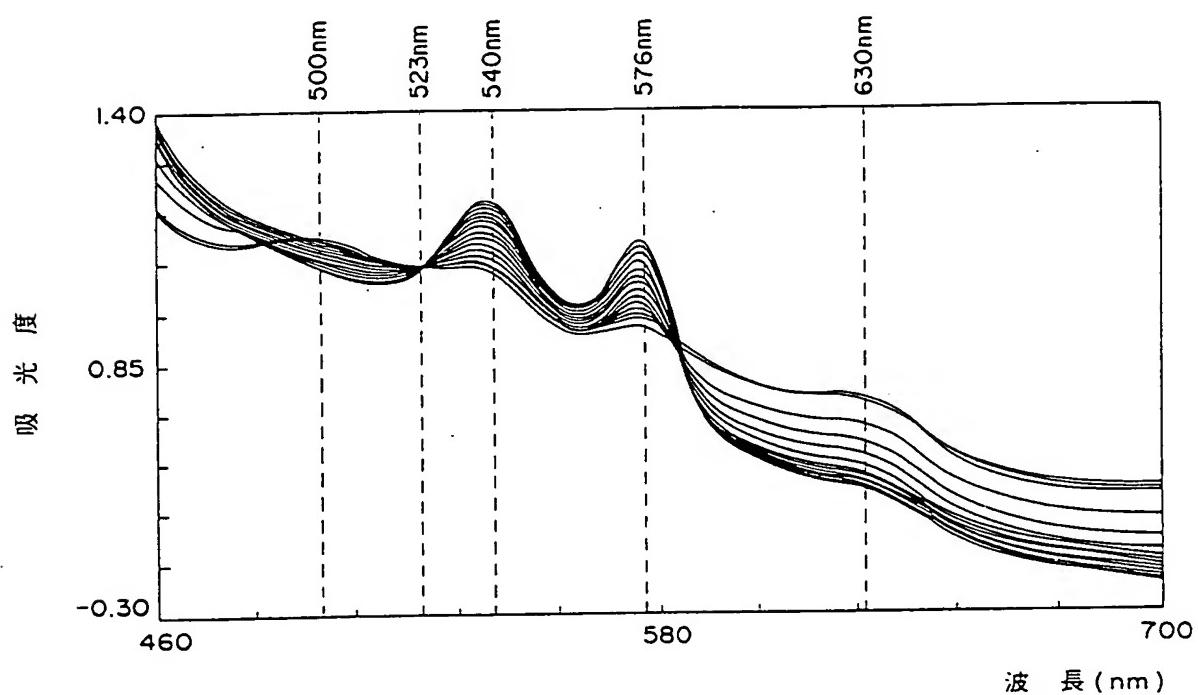
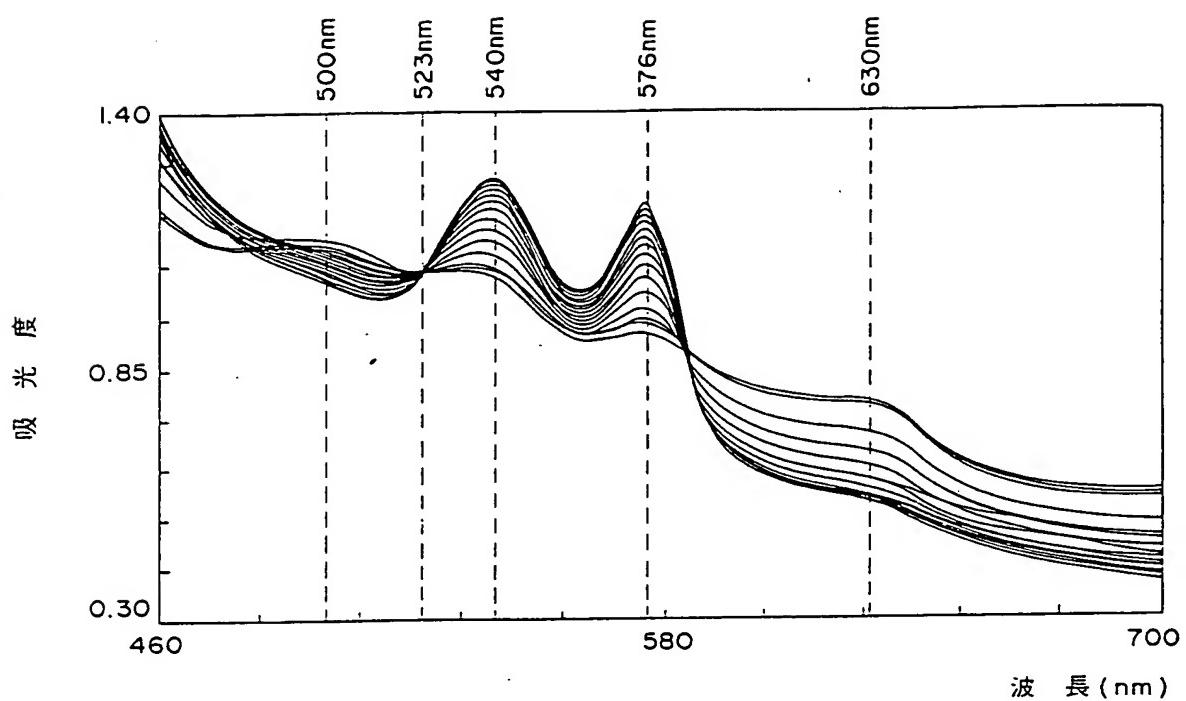
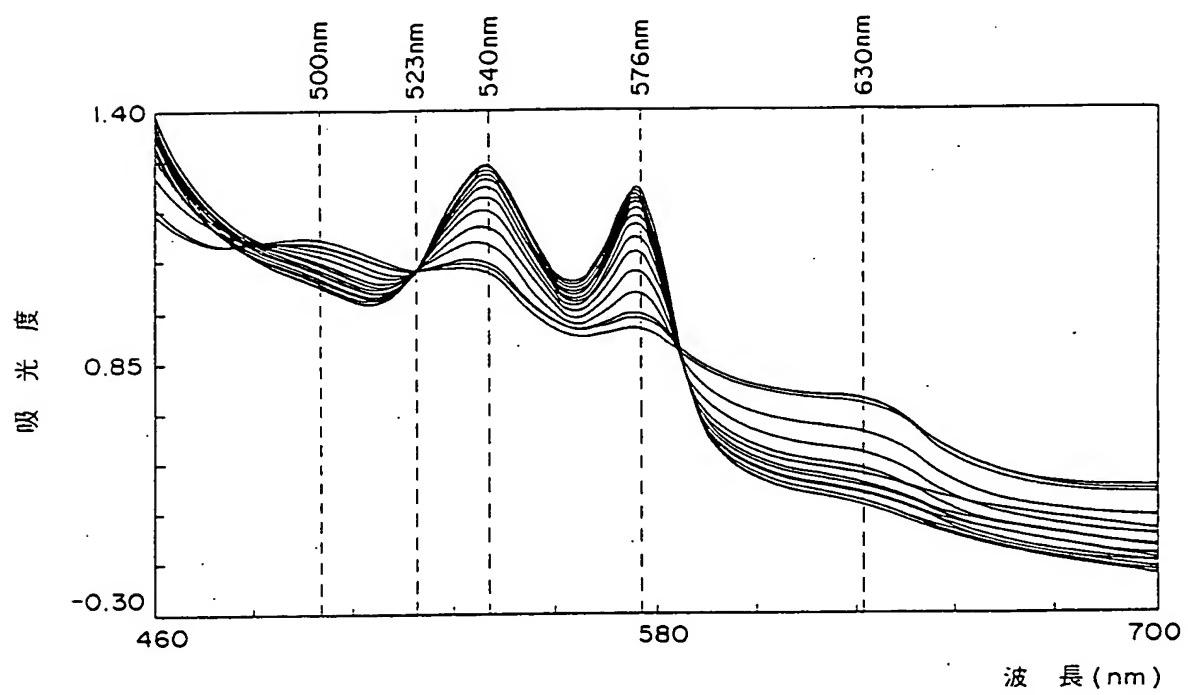
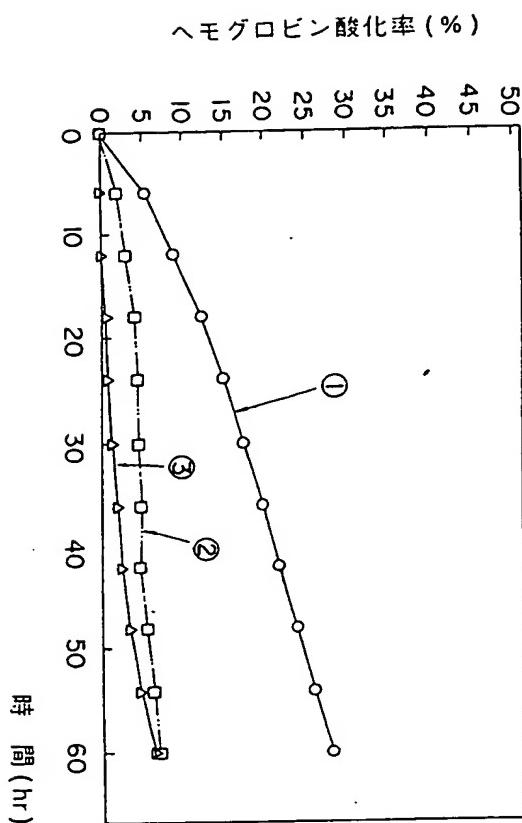
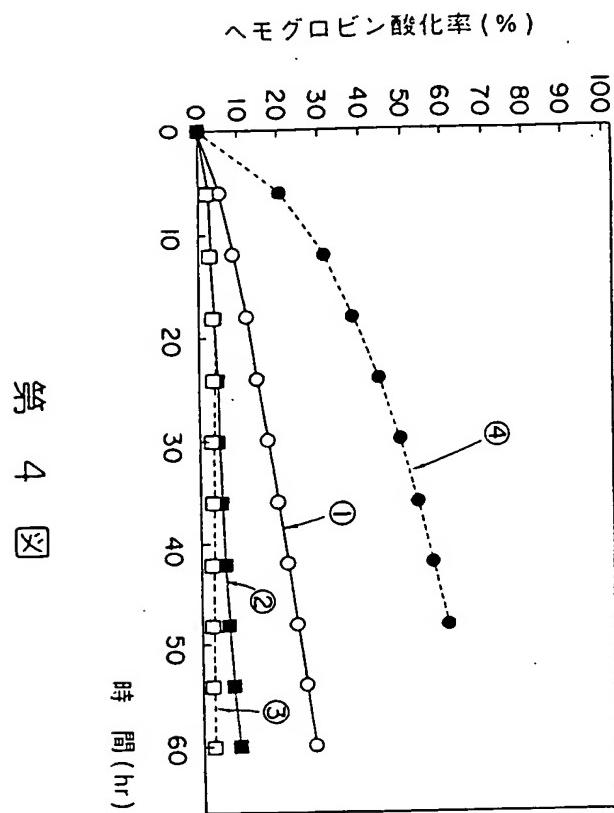


図 2 (c)

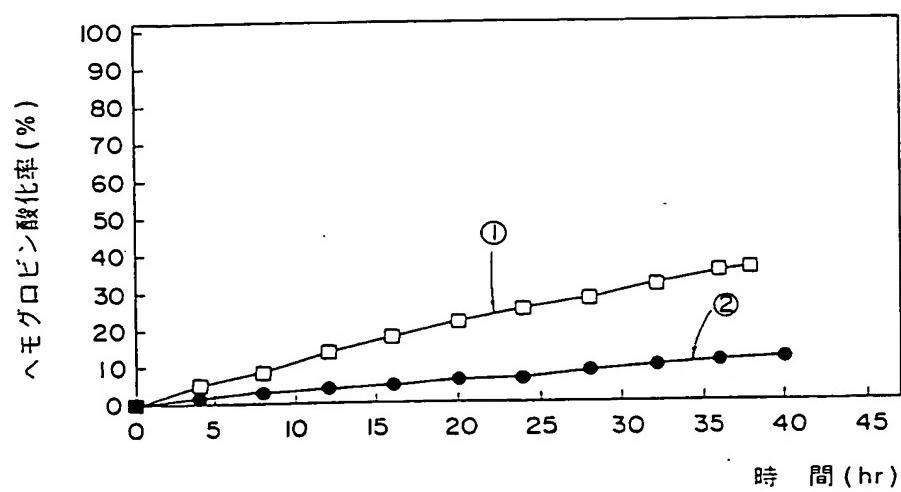
第2図
(d)第2図
(e)



第3図



第4図



第5図